云 南 植 物 研 究　2008, 30 (1): 64～68
Acta Botanica Yunnanica　DOI: 10.3724/SP. J. 1143. 2008. 07071

羽叶金合欢的DNA提取和SSR引物筛选*

高　洁[1,2], 李巧明[1**]
(1 中国科学院西双版纳热带植物园植物系统与保护生物学实验室, 云南 昆明　650223;
2 中国科学院研究生院, 北京　100049)

摘要: 利用SSR分子标记对羽叶金合欢 (*Acacia pennata*) 的野生种和栽培种进行了分析, 利用改良的CTAB方法优化了其总DNA的提取方法, 并优化了PCR扩增条件。从已有的金合欢属植物的82对SSR引物中筛选出多态性高, 稳定性好的12对引物作为羽叶金合欢的SSR分析引物, 为进一步对其进行遗传多样性研究提供了依据。

关键词: 羽叶金合欢; DNA提取; SSR引物筛选
中图分类号: Q 945　**文献标识码**: A　**文章编号**: 0253-2700 (2008) 01-064-05

The DNA Extracting and SSR Primer Screening of *Acacia pennata* (Leguminosae)

GAO Jie[1,2], LI Qiao-Ming[1 **]
(1 *Laboratory of Plant Phylogenetics and Conservation Biology*, *Xishuangbanna Tropical Botanical Garden*,
Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;
2 *Graduate University of Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100049, China)

Abstract: The total DNA of wild *Acacia pennata* and cultivated variety were analyzed using SSR markers. We improved CTAB DNA isolation method and PCR amplified conditions. 12 primers were screened from 82 primers existing in *Acacia* genus, which had high polymorphism and stability. The results provided references for genetic diversity research of *Acacia pennata* using SSR marker.

Key words: *Acacia pennata*; DNA extracting; SSR primer screening

羽叶金合欢 (*Acacia pennata* (Linn.) Willd) 又名臭菜, 隶属于豆科 (Leguminosae) 金合欢属 (*Acacia* Miller)。为大型木质藤本, 分布于云南、广东、福建、广西及印度东部、中南半岛和非洲; 喜温耐热, 多分布在海拔1 900 m以下的低山丘陵、村寨附近或林地边 (中国科学院中国植物志编辑委员会, 1988)。其嫩叶, 根, 及树皮均具有药用价值; 茎可用作木材, 且臭菜营养丰富, 具有较高的经济价值 (中国科学院国家计划委员会自然资源综合考察委员会, 1990)。由于人类的过度采伐, 野生臭菜已濒临灭绝 (许又凯等, 2004)。我们曾对云南西双版纳地区的野生臭菜进行考察, 发现大面积的野生臭菜林已经很少见到, 只有少数的零星分布。目前, 对于臭菜的研究主要包括民族植物学, 扦插繁殖, 人工栽培 (潘奇, 2004), 营养成分分析等方面 (许又凯等, 2004), 其遗传多样性方面的研究未见报导。

---

[*] 基金项目: 中国科学院方向性项目 (KSCX2-YW-Z-002), 云南省自然科学基金 (2002C0018Q) 及中国科学院知识创新工程青年人才领域前沿项目

[**] 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: lqm@xtbg.ac.cn

收稿日期: 2007-04-02, 2007-08-03 接受发表

作者简介: 高洁 (1982-) 女, 在读硕士研究生, 主要从事保护遗传学研究。

由 Moore 等（1991）创立的 SSR（simple sequence repeats）简单重复序列即微卫星 DNA，微卫星 DNA 是中性的，呈共显性的孟德尔式遗传（Levinson，1987），它具有比其它分子标记（如等位酶、RFLP、RAPD 等）更多的可检测等位基因位点，能够提供更细致的基因变化分析范围。该方法在居群遗传学研究中表现出很大的潜力（张军丽等，2000）。SSR 标记需要特异性的引物，而且不同的引物所要求的反应条件也不同，因此对引物的筛选和反应条件的优化是非常必要的，筛选出多态性高，稳定性和可重复性好的引物是整个实验成功的关键。本实验以羽叶金合欢叶片为材料，研究了其基因组 DNA 的提取和 SSR 引物筛选，为从 DNA 水平揭示羽叶金合欢的遗传多样性奠定了基础，具有重要的科学价值。

1　材料和方法

1.1　材料

实验所用的羽叶金合欢栽培种采自当地少数民族村寨混农林系统中的庭园绿篱生态系统；通过询问当地村民确定栽培种的引种来源，即在野生种的分布地对相应的野生居群进行采样。栽培种和野生种均随机取样，每株取其幼嫩叶片，用变色硅胶干燥，室温保存。各个居群的位置及采样个体数详见表 1。

供筛选的引物来自国外对金合欢属其余种马占相思 *Acacia mangium*（Buteher 等，2000），阿拉伯金合欢 *Acacia nilotica* ssp. *indica*（Wardill 等，2004），大叶相思 *Acacia auriculiformis*（Ng 等，2005）和短穗金合欢 *Acacia brevispica* Harms subsp. *dregeana*（Adriana 等，2005）研究开发出的 82 对 SSR 引物，所有引物均由上海生物工程有限公司合成。

1.2　方法

1.2.1　DNA 的提取　采用常规 CTAB 法提取的羽叶金合欢 DNA 中含有部分白色杂质。我们经过反复实验，对 Zeng 等（2002）的方法做了稍许修改，先用 Buffer Ⅰ（200 mmol Tris-HCl，50 mmol EDTA，250 mmol NaCl）1.5 ml，6 μl β-巯基乙醇加入磨成粉状的材料冰浴 10 min，不时摇匀→4℃，7 000 r/min 离心 10 min→再加入提前预热的 950 μl 3×CTAB 裂解→64℃水浴 1 h→用氯仿 - 异戊醇（24∶1，v/v）萃取→1 000 r/min 离心 10 min，取上清（重复 2 次）→用 700 μl 异丙醇沉淀，-20℃过夜→然后用 70%乙醇洗 3 次→加入 100 μl 1×TE 溶解→4℃保存。增加了 Buffer Ⅰ 1.5 ml，6 μl β-巯基乙醇和材料冰浴的步骤洗去杂质后所得 DNA 质量明显提高，杂质减少。

1.2.2　引物筛选　从两个栽培居群和一个野生居群中各挑选一个质量较好的 DNA 样品，共 3 个样品，从金合欢属植物的 82 对 SSR 引物中筛选合适的引物，进行扩增。

1.2.3　PCR 扩增　PCR 扩增反应在 ABI 9700 上完成，所需的 Mg^{2+}、DNA 聚合酶、10×Buffer 均来自 TaKaRa 公司（宝生物工程（大连）有限公司），根据实际情况对 Mg^{2+}、DNA 及酶的浓度进行了优化；每次 PCR 做一个负对照来检测试剂是否污染。

引物 P1，P9，P10，P11，采用 25 μl 反应体系：25 mmol $MgCl_2$ 2 μl，50 mmol KCl，10 mmol Tris-HCl（pH8.3）5 μl，10 mmol dNTPs（TaKaRa）2 μl，10 μmol 的引物 1 μl，5 U/μl 的 Taq DNA 聚合酶 0.2 μl，10 ng/μl 的模板 DNA 2 μl 以及 ddH_2O 11.3 μl。扩增程序为：94℃ 2 min；94℃ 30 s，退火（温度视不同引物而定，表 2）30 s，72℃ 60 s，30 个循环；72℃ 10 min。

引物 P2，P4，P5，P6，P12，P13，P15 采用 25 μl 反应体系：25 mmol $MgCl_2$ 3 μl，50 mmol KCl，10 mmol Tris-HCl（pH8.3）5 μl，10 mmol dNTPs 2 μl，10 μmol 的引物 2 μl，5 U/μl 的 Taq DNA 聚合酶 0.2 μl，10 ng/μl 的模板 DNA 2 μl 以及 ddH_2O 8.8 μl。扩增程序为：94℃ 2 min；94℃ 30 s，退火（温度视不同引物而定，表 2）30 s，72℃ 20 s，35 个循环；72℃ 10 min。

引物 P8，采用 25 μl 反应体系：25 mmol $MgCl_2$ 2 μl，50 mmol KCl，10 mmol Tris-HCl（pH8.3）5 μl，0.15 mmol dNTPs 2 μl，10 μmol 的引物 1 μl，5 U/μl 的 Taq DNA 聚合酶 0.2 μl，10 ng/μl 的模板 DNA 2 μl 以及 ddH_2O 11.3 μl。扩增程序为：96℃ 20 s，退火（温度视不同引物而定，表 2）（每个循环降低 0.5℃）20 s，72℃ 30 s，21 个循环；

表 1　羽叶金合欢居群的采样数目及地点

Table 1　Locations of *Acacia pennata* populations and the numbers of individuals sampled

居群编号 Population code	分布地 Locality	野生居群大小（株）Wild population size	野生居群采样数（株）Wild samples	栽培居群大小（株）Cultivated population size	栽培居群采样数（株）Cultivated samples	经纬度 Latitude and Longitude
景洪（JH）	景洪市勐罕镇	18	18	27	20	100.78°E 21.93°N
勐仑（MDJ）	勐腊县勐仑镇	22	21	34	20	101.25°E 21.91°N
勐腊（BB）	勐腊县补蚌村	23	17	30	22	101.63°E 21.53°N
总计 Total		63	56	91	62	

96℃ 20 s，降至最低点的退火温度 20 s，72℃ 30 s，15 个循环；72℃ 10 min。

1.2.4 PCR 产物检测 4 μl 扩增产物加入 4 μl 3×Loading-buffer，94℃变性 5 min 后置于冰上待用。采用凝胶浓度 6％的变性聚丙烯酰胺凝胶系统，电泳仪为 Bio-Red 公司的 Power Pac-3000，缓冲液为 1×TBE。80 W 预电泳 1.5 h，然后 110 W，电泳 2.5 h。

卸胶后，用 10％乙醇，1％冰乙酸固定 10 min；去离子水漂洗 1 min；1.5％硝酸轻摇 3 min 取出后去离子水漂洗 1 min；用提前预冷的 0.05％硝酸银染色 20 min；去离子水漂洗 2 次，各 30 s；最后将胶板置于 500 ml 3％碳酸钠，0.5％的 360 μl 甲醛中充分摇动，直至看见第一条带，再加入 1 500 ml 显色液，摇至所有条带都清晰可见用 50 ml 冰乙酸和 150 ml 去离子水终止显色；去离子水漂洗两次，然后晾干。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取方法的优化

DNA 质量的好坏直接关系到实验的成败。为了得到高质量的基因组 DNA，我们对常规 CTAB 法进行改良，增加了 Buffer Ⅰ 1.5 ml，6 μl β-巯基乙醇和材料冰浴的步骤洗去杂质，获得了较高质量的 DNA（图 1）。

2.2 扩增条件的优化

为了得到较为理想的扩增产物及多态性，实验中在反应体系中加入不同浓度的 $MgCl_2$、dNTP、模板 DNA，并以 46～60℃的退火温度处理，研究这些因素对扩增产物的影响。我们发现关键是要调节模板 DNA 浓度，引物浓度，以及 PCR 过程中的退火温度高低，该结论与徐兴兴等（2006）对苹果和丁燕红等（2006）对小豆的 SSR 反应条件优化所得结论一致。我们得到了上述最佳的试剂浓度和扩增反应条件。在此条件下，每个引物均能产生较为清晰的条带。

2.3 SSR 引物的筛选

随着 SSR 标记在不同的分类单位上的应用，为根据不同的分类单位设计引物提供了基础，也可参考相近亲缘种来设计引物，一旦微卫星位点在某一物种中分离并测序，它可被用于近缘种的分析（王丽和赵桂仿，2005）。本研究根据国外对金合欢属其余种马占相思，阿拉伯金合欢，大叶相思和短穗金合欢的 SSR 标记的研究，从所采用的 82 对引物中筛选合适的引物，进行扩增。通过实验发现上述物种的 SSR 引物通用性较低，大多数引物都不能扩增出理想的产物，多态性很低。我们淘汰了无扩增带和扩增后多态性不理想的引物，选留那些扩增条带清晰而且有明显多态性片段的引物。最终获得适用于羽叶金合欢研究的 12 对引物（引物序列及退火温度见表 2，图 2）。

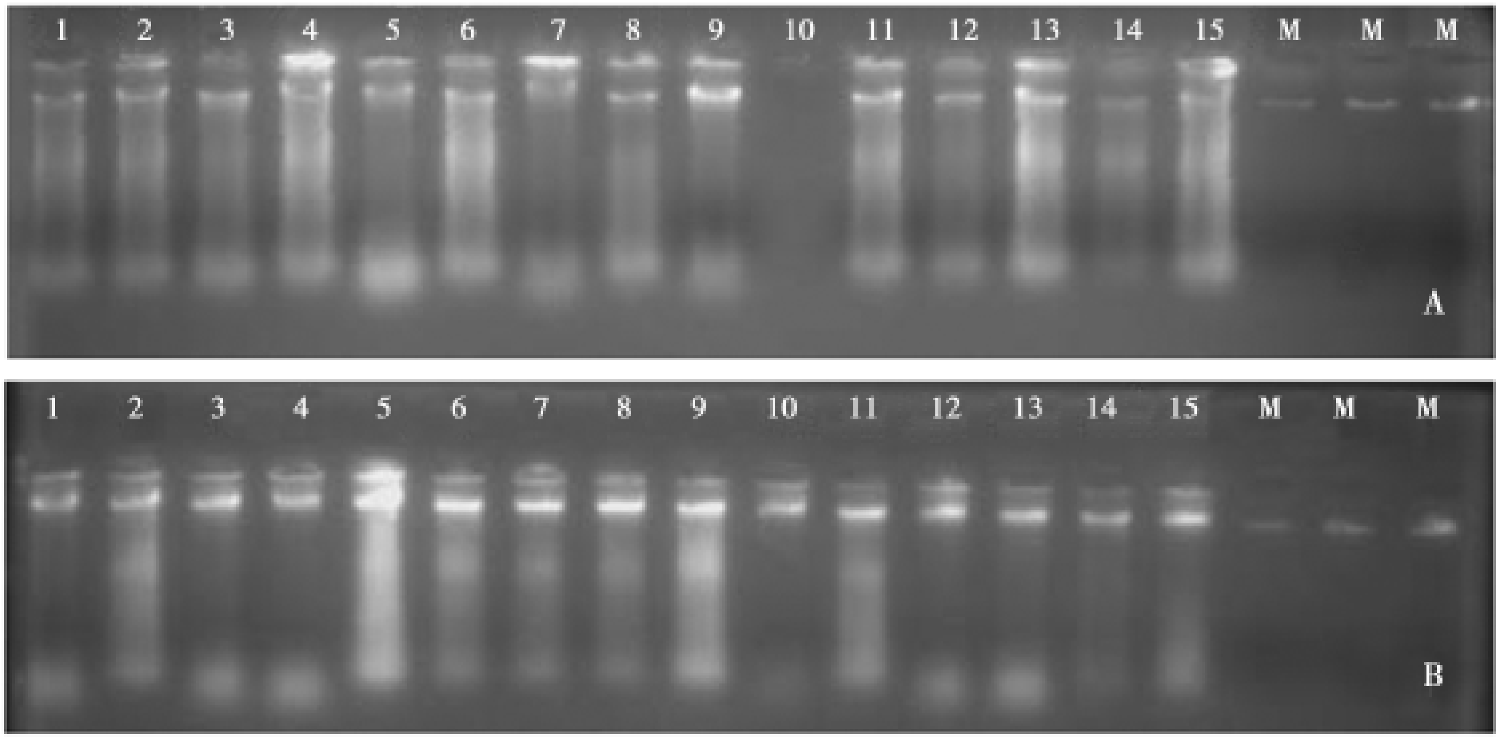

图 1 羽叶金合欢 MDJ 1～15 号样品两种方法所提总 DNA

（A 为常规 CTAB 法提取的总 DNA，B 为改良的 CTAB 法提取的总 DNA）

Fig. 1 The total DNA was extracted from fifteen samples of *Acacia pennata* using two methods

（A: The total DNA was extracted using the usual CTAB method; B: The total DNA was extracted using the improved CTAB method.）

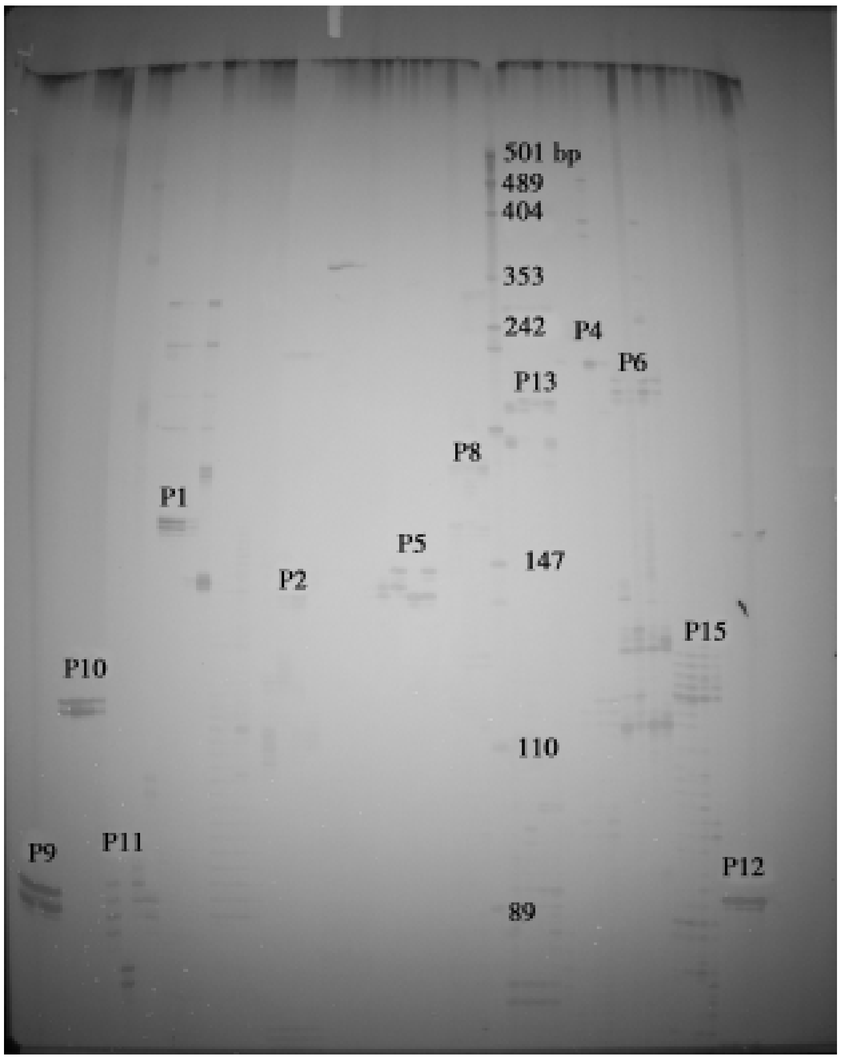

图 2　12 对 SSR 引物扩增出的多态性谱带

Fig . 2　SSR banding patterns were produced by the twelve selected primers

表 2　筛选出的用于羽叶金合欢扩增的 SSR 引物序列及退火温度

Table 2　Primer sequences, annealing temperatures were used for *Acacia pennata*

引物编号 Primer number	引物序列 (5′—3′) Sequence	退火温度 Annealing tempecture (℃)
P1	CCTTCTTCTCTCATCTACCAAACC CCCACATCATCACTCACAACT	48
P2	TTCAGGCCTCTCTCTCTCT TCGCCTAAATCCTTCCCAA	50
P4	GTCGCGTACACAGACACAGT GGCGCACCTCTCTCTCTCT	50
P5	GGCGCAACTCTCTCTCTCT TTGGTCACTTAGCGCATGCC	48
P6	GATAGCTCATAGAAACACCATACC GGCGAAGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	48
P8	GCTTTTGGCTCTTGATA AGGGCAAAATGGTCAT	60
P9	GAGGTAATATTTTGAATTCCTTGAAC GGTGTATACCTCTTTCCTGTGG	48
P10	CCCATTGCCGTTTCTTTG GCATTTCCCTTGGAACAGTC	46
P11	CGCAACTCCATCTGATTTACTG TTATGTTGGGTTAATACGCTAACTG	46
P12	GGGGAGGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT GTGACCTGAGTTAGGAAGGAGC	48
P13	GTGAAGGCTCTCTCTCTCT GGAGATGGATAGAGATGGCC	48
P15	GGGGGAGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT GCTACTAAGGTTTCTTTCACGG	50

3　讨论

SSR 是目前较为理想的遗传标记技术之一，但要获得 SSR 微卫星 DNA 标记一般需要建立、筛选基因组文库，克隆测序，引物设计等一系列实验，人力、物力消耗巨大。随着对微卫星研究技术的深入，由于其核苷酸序列的保守性，使得一物种的微卫星引物可能被用于近缘物种，从而有效地减少了设计 SSR 标记的繁琐操作，弥补了其不足。本实验从金合欢属植物的 SSR 引物中筛选出适合羽叶金合欢使用的 12 对引物，它们均能扩增出稳定的条带。我们用引物 P1 对部分居群材料进行了扩增，每个样品均能获得清晰的扩增条带，多态位点较多（图 3）。实验过程中所选的材料包括了羽叶金合欢的野生和栽培居群，具有一定的代表性，本研究初步建立了羽叶金合欢 SSR 扩增实验体系，为进一步进行遗传多样性研究奠定了基础；目前国内尚未见羽叶金

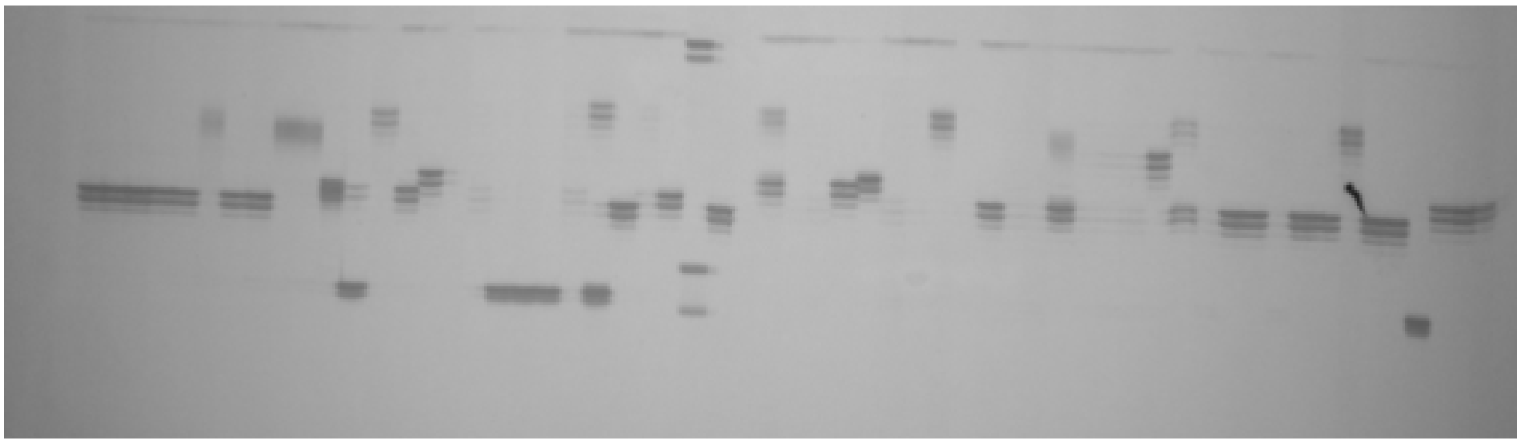

图 3　引物 P1 对羽叶金合欢勐仑、景洪、勐腊自然居群扩增的结果

Fig . 3　The amplificated products of Menglun, Jinghong, and Mengla natural populations of *Acacia pennata* using primer P1

合欢遗传多样性方面的研究，对金合欢属植物的研究也只限于生理生态方面，从DNA水平揭示该属植物的遗传资源方面的研究还未见报导。国外对金合欢属植物的研究包括了对杂交种的鉴定，繁育系统的研究，本研究也为该属植物的研究提供了有效的SSR分子标记引物。随着对羽叶金合欢的进一步开发利用和研究，SSR分子标记将应用于羽叶金合欢的品种鉴定，遗传分析，遗传图谱建立，分类研究和种质资源鉴定等各个领域。

致谢 本研究的野外考察与样品采集，得到了王洪老师的大力支持；在实验过程中得到慈秀芹、李朗、汪书丽、郑丽等同学的积极帮助；论文的绘图工作得到了甘宏协同学的热心协助。

〔参考文献〕

中国科学院中国植物志编辑委员会，1988．中国植物志（第30卷）[M]．北京：科学出版社，36

中国科学院国家计划委员会自然资源综合考察委员会，1990．中国自然资源手册[M]．北京：科学出版社，36—37

Adriana OA，Schnabel A，Travis *et al.*，2005．Isolation and characterization of microsatellite markers in the East African tree *Acacia brevispica*（Fabaceae：Mimosoideae）[J]．*Mol Ecol Note*，**5**：366—368

Butcher PA，Decroocq S，Gray Y *et al.*，2000．Development，inheritance and cross-species amplification of microsatellite markers from *Acacia mangium*[J]．*Theoreti Appl Genet*，**101**：1282—1290

Ding YH（丁燕红），Jin WL（金文林），Zhao B（赵波）*et al.*，2006．Optimization of SSR-PCR amplified condition in adzuki bean[J]．*J Beijing Agric Coll*（北京农学院报），**21**（1）：14—17

Levinson G，Gutman GA，1987．Slipped-strand mispairing：a major mechanism for DNA squence evolution[J]．*Mol Biol Evolut*，**4**：203—281

Moore SS，Sargent LL，King TJ *et al.*，1991．The conservation of dinucleotide microsatellites among mammahan genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species[J]．*Genomics*，**10**：654—660

Ng CH，Kon SC，Lee SL *et al.*，2005．Isolation of 15 polymorphic microsatellite loci in *Acacia* hybris（*Acacia mangium*×*Acacia auriculiformis*）[J]．*Mol Ecol Note*，**5**：572—575

Pan Q（潘奇），2004．The study of artificial cultibation of *Acacia pennata*[J]．*The Yunnan Agric*（云南农业），**11**：7

Wardill TJ，Scott KD，Graham GC *et al.*，2004．Isolation and characterization of microsatellite loci from *Acacia nilotica* ssp. *indica*（Mimosaceae）[J]．*Mol Ecol Note*，**4**：361—363

Wang L（王丽），Zhao GF（赵桂仿），2005．Micro-satellite primers shared by different plant species and genera[J]．*Acta Bot Boreal-Occident Sin*（西北植物学报），**25**（8）：1540—1546

Xu XX（徐兴兴），Liang HY（梁海永），Zhen ZX（甄志先）*et al.*，2006．Estallishment of SSR analysis systerm in apple[J]．*J Fruit Sci*（果树学报），**23**（2）：161—164

Xu YK（许又凯），Liu HM（刘宏茂），Dao XS（刀祥生）*et al.*，2004．The study on the nutritional cotents of *Acacia pennata* and its evaluation as a wild vegetable[J]．*Guihaia*（广西植物），**24**（1）：12—16

Zhang JL（张军丽），Wang ZF（王峥峰），Li MG（李鸣光）*et al.*，2000．Molecular markers and their application in plant population research[J]．*Chin J Appl Ecol*（应用生态学报），**11**（4）：631—636

Zeng J，Zou YP，Bai JY *et al.*，2002．Preparation of total DNA from ‘recalcitrant plant taxa’[J]．*Acta Bot Sin*（植物学报），**44**：694—697